

革兰氏阳性细菌基因组 DNA 提取方法的比较及优化

庞建^{1,2} 刘占英^{1,2*} 郝敏^{1,2} 兰辉¹ 吴涛¹

(1. 内蒙古工业大学 化工学院 内蒙古 呼和浩特 010051)

(2. 内蒙古工业大学 煤炭转化与循环经济研究所 内蒙古 呼和浩特 010051)

摘要:【目的】基因组 DNA 提取效率和质量对分子生物学相关研究起着关键的作用, 革兰氏阳性细菌由于细胞壁较厚、难破裂使其基因组 DNA 提取的难度增大, 本文旨在寻找一种高效稳定的 DNA 提取方法。【方法】以 *Clostridium thermocellum* 和 *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* 为实验菌株, 使用 6 种 DNA 提取方法对 *C. thermocellum* 基因组 DNA 进行提取, 对比其提取效果和产率。【结果】改良的 SDS-碱裂解法提取得到的 DNA 浓度较高 (400 mg/L 左右), 且平行样间浓度和纯度稳定。【结论】为革兰氏阳性细菌基因组 DNA 提取提供参考。

关键词: 革兰氏阳性细菌, 基因组 DNA, 提取方法

Comparison and optimization of methods for genomic DNA extraction from Gram positive bacteria

PANG Jian^{1,2} LIU Zhan-Ying^{1,2*} HAO Min^{1,2} LAN Hui¹ WU Tao¹

(1. School of Chemical Engineering, Inner Mongolia University of Technology, Hohhot, Inner Mongolia 010051, China)

(2. Institute of Coal Conversion & Cyclic Economy, Inner Mongolia University of Technology, Hohhot, Inner Mongolia 010051, China)

Abstract: [Objective] The quality and efficiency of genomic DNA extraction play a key role in molecular biology research. The cell wall of Gram positive bacterium is thick and hard to be destroyed, which makes it difficult for genomic DNA extraction. The objective of this study was to find an efficient and repeatable method to extract the genomic DNA from Gram positive bacterium. [Methods] The genomic DNA of *Clostridium thermocellum* and *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* were extracted using six extraction methods. The DNA concentration and DNA purity were compared for these methods. [Results] The results showed that the concentration of DNA was highest (about

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 61361016); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金项目(No. 2013151412000); 内蒙古自治区草原英才工程项目; 内蒙古自治区高等学校青年科技英才支持计划项目; 中国科学院“西部之光”人才培养计划项目; 内蒙古自治区人才开发基金项目; 内蒙古自然科学基金项目(No. 2013MS0511); 内蒙古人社厅留学人员科技活动项目; 内蒙古科技攻关项目; 兰州重离子加速器国家实验室开放课题

*通讯作者: ✉: liuzy1979@yeah.net

收稿日期: 2015-02-10; 接受日期: 2015-04-07; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-05-08

400 mg/L) and the consistency of DNA concentration and DNA purity were best when improved SDS alkaline lysis method was used. [Conclusion] This research provided a reference for the extraction of genomic DNA from Gram positive bacterium.

Keywords: Gram positive bacterium, Genomic DNA, Extraction method

随着分子生物学的不断发展,细菌基因组 DNA 的提取已成为一种常规的实验手段,但作为分子生物学研究的第一步,高效稳定的细菌基因组 DNA 提取方法对后续分子生物学的研究有着重要的意义。革兰氏阳性细菌细胞壁是由一层厚且致密的肽聚糖和磷壁酸组成,而肽聚糖的肽链通过 5 个甘氨酸互相交联着,不易裂解,而目前通行的分子生物学手册中,提取基因组总 DNA 均以革兰氏阴性菌大肠杆菌为例,这些方法在高效提取革兰氏阳性细菌基因组 DNA 方面有一定的局限性^[1]。作为分子生物学研究的基础,细菌样品中基因组 DNA 的浓度、纯度、片段大小及一致性,对后续 PCR 和克隆的效果会产生较大影响,更制约着 Q-PCR 的准确性^[2]。张涛涛等^[3]的研究也表明 DNA 提取方法对基因组 DNA 的质量、得率以及后续 PCR 扩增效果影响显著,因此,选用适宜的 DNA 提取方法对研究至关重要。为保证革兰氏阳性菌分子生物学实验顺利开展,不但要考虑 DNA 提取得率,还要尽可能地减少 DNA 的降解^[4],并保证不同批次 DNA 提取效率和质量的一致。

1 材料与方 法

1.1 实验菌株

嗜热梭菌(*Clostridium thermocellum*)和热解糖厌氧杆菌(*Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*)均为革兰氏阳性细菌,由达特茅斯学院(Dartmouth College)的 Lynd 教授赠予。

1.2 主要试剂和仪器

蛋白酶 K、溶菌酶、琼脂糖、SDS 均购自 Sigma 公司。

凝胶成像系统 Bio-Rad Gel Doc 2000 型,美国伯乐公司; NanoDrop ND1000 微量紫外分光光度计,基因有限公司;恒温摇床,上海天呈实验仪器

制造有限公司; LDZX-40 II 型立式自动电热压力蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械厂。

1.3 实验方法

1.3.1 培养基和培养条件: 实验采用改良的 MTC 培养基(g/L)^[5]: 丙磺酸 100 (pH 7.9); A 液(酵母粉 50); B 液(柠檬酸钾 50、柠檬酸 31.25、Na₂SO₄ 25、KH₂PO₄ 25、NaHCO₃ 62.5); C 液(尿素 250、NH₄Cl 75); D 液(MgCl₂·6H₂O 50、CaCl₂·2H₂O 10、FeCl₂·4H₂O 5、L-半胱氨酸盐酸盐 50); E 液(盐酸吡哆胺 1、对氨基苯甲酸 0.2、生物素 0.1、维生素 B₁₂ 0.1、维生素 B₁ 0.2); F 液(MnCl₂·4H₂O 0.025、CoCl₂·6H₂O 0.025、ZnCl₂ 0.01、CuCl₂·2H₂O 0.002 5、H₃BO₃ 0.002 5、Na₂MoO₄·2H₂O 0.002 5、NiCl₂·6H₂O 0.002 5)。

将储液按比例加入装有 5 g/L 微晶纤维素(或纤维二糖)为底物的西林瓶中,除氧后分别接种 5% (体积比)*C. thermocellum*、或 *T. thermosaccharolyticum*, 于 55 °C、180 r/min 培养至对数生长期。

1.3.2 几种细菌基因组 DNA 提取方法比较: 选取对数期的 *C. thermocellum* 菌种,用水煮法^[1]、传统法^[6]、CTAB-SDS 法^[7]、SDS-碱裂解法、酚氯法^[8]和 SDS-酶裂解法^[9]提取基因组 DNA。SDS-碱裂解法提取的基因组 DNA 产率较高,但纯度较低,为提高其提取纯度,对该法进行了改良,主要改良之处:在加入碱裂解液 I 的同时加入溶菌酶和 RNase A 酶,改良 SDS-碱裂解法的具体提取步骤为:取菌液 1.5 mL, -4 °C、12 000 r/min 离心 2 min,弃上清液,沉淀依次加入 100 μL 碱裂解液 I (50 mmol/L 葡萄糖, 25 mmol/L pH 8.0 Tris-Cl, 10 mmol/L pH 8.0 EDTA)、溶菌酶和 RNase A 酶,用漩涡振荡仪振荡 1 min。加入 200 μL 现配的碱裂解液 II (0.2 mol/L NaOH 溶液, 1% SDS),快速温柔地颠倒

5次,冰浴20 min。加入150 μL 预冷的碱裂解液III (5 mol/L 醋酸钾 60.0 mL, 冰乙酸 11.5 mL, 灭菌蒸馏水 28.5 mL), 反复颠倒5次, 冰浴5 min后 $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心5 min 取上清液450 μL , 加入等体积的酚/氯仿/异戊醇混匀, 离心, 取上清液450 μL , 加入2倍体积的冰冻无水乙醇, 混合均匀, 室温沉淀DNA 10 min 后离心, 干燥沉淀。沉淀加入1 mL 70%的乙醇, 颠倒混匀后离心, 干燥沉淀。用50 μL 含有RNase A 酶(10 mg/L)的TE溶液重悬, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3.3 基因组DNA产率和纯度及完整性检测: 将提取所得样液DNA按一定倍数稀释后, 用紫外分光光度计测定 OD_{260}/OD_{280} 值和 OD_{260}/OD_{230} 值, 按照1个 OD_{260} 值相当于50 mg/L和稀释倍数来换算DNA的浓度, 并计算DNA的产率, 用 OD_{260}/OD_{280} 的比值表示DNA样品的纯度。取10 μL 基因组DNA提取原液, 用0.8%琼脂糖凝胶, 电泳(1 \times TAE, 5 V/cm) 40 min, 再用核酸染料染色, 紫外透射仪观察和拍照, 检测DNA条带的亮度及基因组DNA完整性。

1.3.4 统计分析: 所有的数据通过3次平行实验收集得到, 利用SAS软件进行方差分析, 肩注小写

字母表示差异的显著性, 肩注大写字母表示差异的极显著性, 显著性由a、b、c.....的顺序依次减弱, 小写字母不同表示差异显著($P<0.05$), 大写字母不同表示差异极显著($P<0.01$), 除非特别说明。

2 结果与分析

2.1 6种提取方法的DNA产率、纯度和完整性

6种提取方法中, 有4种能够提取出*C. thermocellum*基因组DNA, 但提取效果有明显差异, 见表1。其中SDS-碱裂解法的产率最高, 平均达268.27 mg/L, 酚氯法最低, 仅为93.68 mg/L; SDS-碱裂解法的 OD_{260}/OD_{280} 平均值在1.7以下, 提取的DNA纯度较低, 可能是残留的蛋白质较多。酚氯法的 OD_{260}/OD_{280} 平均值为1.77, 提取的DNA蛋白质去除效果较好, 但 OD_{260}/OD_{230} 值为0.97, DNA盐分去除效果最差, 传统法和SDS-酶裂解法提取所得DNA纯度及产量均较低。综上, 对SDS-碱裂解法进行改良, 在保持其产率的条件下, 提高纯度。

DNA样液琼脂糖凝胶电泳分析图谱, 见图1。从图1中可以看出, 4种提取方法均有基因组DNA条带。虽加样量均为10 μL , 但DNA条带的亮度

表1 6种不同DNA提取方法对*C. thermocellum*提取效果的比较
Table 1 Comparison of six kinds of methods for genomic DNA extraction from *C. thermocellum*

提取方法 Method of extraction	OD_{260}/OD_{280} ($\bar{x}\pm s$)	OD_{260}/OD_{230} ($\bar{x}\pm s$)	产率 Productivity (mg/L)
传统法 Traditional method	1.48 \pm 0.04 ^{Dd}	1.10 \pm 0.03 ^{Cc}	230.85 \pm 3.13 ^{Bb}
SDS-碱裂解法 SDS-baselysis method	1.64 \pm 0.03 ^{Bb}	1.65 \pm 0.01 ^{Aa}	268.27 \pm 7.39 ^{Aa}
酚氯法 Phenol-chloroform method	1.77 \pm 0.07 ^{Aa}	0.97 \pm 0.01 ^{Dd}	93.68 \pm 1.87 ^{Dd}
SDS-酶裂解法 SDS-enzyme lysis method	1.58 \pm 0.01 ^{Cc}	1.49 \pm 0.02 ^{Bb}	135.93 \pm 9.72 ^{Cc}

注: 肩注小写字母表示差异的显著性, 肩注大写字母表示差异的极显著性, 显著性由a、b、c...的顺序依次减弱, 小写字母不同表示差异显著($P<0.05$), 大写字母不同表示差异极显著($P<0.01$), 除非特别说明。

Note: The values in the table are: $\bar{x}\pm s$. A-D: $\bar{x}\pm s$ within the columns with uppercase superscripts is different. a-d: $\bar{x}\pm s$ within the columns of with lower-case superscripts is significantly different.

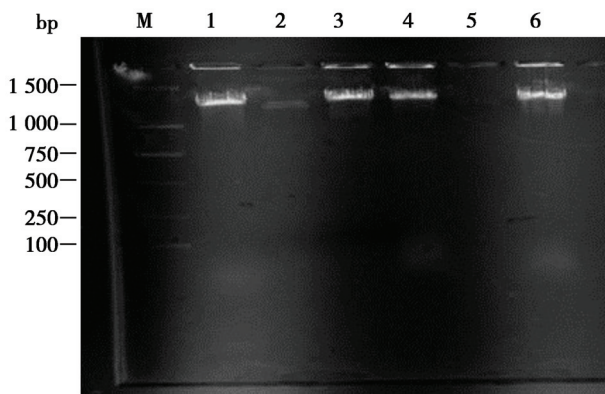


图 1 不同方法提取 *C. thermocellum* 基因组 DNA 的电泳图谱

Figure 1 The electrophoretogram of *C. thermocellum* genomic DNA with different extraction methods

注: M: Marker; 1: 传统法; 2: CTAB-SDS 法; 3: SDS-碱裂解法; 4: 酚氯法; 5: 水煮法; 6: SDS-酶裂解法。

Note: M: Marker; 1: Traditional method; 2: CTAB-SDS method; 3: SDS-baselysis method; 4: Phenol-chloroform method; 5: The water boiling; 6: SDS-enzyme lysis method.

明显不同, SDS-碱裂解法和传统法的条带亮度较酚氯法和 SDS-酶裂解法明显亮, 即提取所得产率较高, 这也说明前 2 种方法产率高, 与紫外检测结果相符。

2.2 改良 SDS-碱裂解法 DNA 提取效果验证

改良 SDS-碱裂解法提取 *C. thermocellum* 和 *T. thermosaccharolyticum* 基因组 DNA 产率见表 2。其中 *C. thermocellum* 基因组 DNA 产率为 418.23 mg/L, 较未改良前产率提高近 2 倍, 且 2 株菌的 OD_{260}/OD_{280} 值和 OD_{260}/OD_{230} 值均在 1.8-2.0 之间, 说明提取所得基因组 DNA 中蛋白质和盐分去除效果均较好, 有利于后续实验的进行。

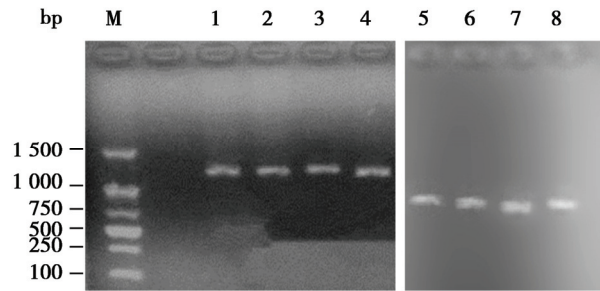


图 2 改良 SDS-碱裂解法电泳检测图

Figure 2 The electrophoretogram of genomic DNA with improved SDS alkaline lysis method

注: M: Marker; 1-4: 改良 SDS-碱裂解法所提 *C. thermocellum* 基因组 DNA; 5-8: 改良 SDS-碱裂解法所提 *T. thermosaccharolyticum* 基因组 DNA。

Note: M: Marker; 1-4: Genomic DNA of *C. thermocellum* with improved SDS alkaline lysis method; 5-8: Genomic DNA of *T. thermosaccharolyticum* with improved SDS alkaline lysis method.

DNA 样液琼脂糖凝胶电泳分析图谱, 见图 2。从图 2 中可以看出, 改良 SDS-碱裂解法提取所得基因组 DNA 条带完整性较好, 杂质去除效果好。基因组 DNA 条带的亮度一致, 说明提取所得基因组 DNA 产率基本一致, 稳定性好, 与紫外检测结果相符。

实验通过对比目前常见的 6 种提取方法, 对提取所得 *C. thermocellum* 的基因组 DNA 质量和得率进行比较后, 对 SDS-碱裂解法进行了改良, 发现改良后的 SDS-碱裂解法提取所得 *C. thermocellum* 和 *T. thermosaccharolyticum* 的 DNA 纯度和完整性都较高, 且产率、纯度和稳定性明显比未改良前有所提高, 这说明本实验在加入碱裂解液 I 的同时加入溶菌酶和 RNase A 酶的改进是成功的, SDS 不仅

表 2 改良的 SDS-碱裂解法 DNA 提取效果验证

Table 2 The concentrations and purities of genomic DNA with improved SDS alkaline lysis method

菌种 Strain	OD_{260}/OD_{280} ($\bar{x} \pm s$)	OD_{260}/OD_{230} ($\bar{x} \pm s$)	产率 Productivity (mg/L)
<i>C. thermocellum</i>	1.89±0.01	1.93±0.03	418.23±18.45
<i>T. thermosaccharolyticum</i>	1.90±0.02	1.87±0.02	397.51±12.76

可以破坏细胞膜,并且可以促进溶菌酶的乳化作用^[10],二者结合,促进了细胞的裂解,进而优化了基因组 DNA 的提取步骤,也为其他革兰氏阳性菌总 DNA 的提取提供参考。

3 结论

通过比较水煮法、传统法、CTAB-SDS 法、SDS-碱裂解法、酚氯法和 SDS-酶裂解法对革兰氏阳性细菌(*Clostridium thermocellum*)基因组 DNA 的提取效率和产率发现, SDS-碱裂解法提取所得基因组 DNA 产率最高,为 268.27 mg/L,但 OD_{260}/OD_{280} 值为 1.64 且 OD_{260}/OD_{230} 值为 1.65,说明蛋白质和其他影响后续检测的杂质去除情况较差,为适应基因组 DNA 的提取需要,也为后续实验的进行打下良好的基础,因此对其进行改良。改良后的 SDS-碱裂解法提取所得 *C. thermocellum* 和 *T. thermosaccharolyticum* 基因组 DNA 产率分别为 418.23 mg/L 和 397.51 mg/L、 OD_{260}/OD_{280} 值分别为 1.89 和 1.90,且 OD_{260}/OD_{230} 值分别为 1.93 和 1.87,说明改良 SDS-碱裂解法提取所得 2 株不同革兰氏阳性菌的产率稳定,且纯度较高,有利于后续实验的进行。此外,本法所用试剂价格便宜、性质稳定,适用于一般实验室的提取需求。

参考文献

[1] Hu XH, Peng HM, Liu X, et al. Methods of DNA extraction from bacteria for PCR and real-time PCR[J]. Journal of Chongqing Medical University, 2008, 33(2): 155-158 (in Chinese)

- 胡晓红, 彭惠民, 刘昕, 等. PCR 及 Real-time PCR 评价细菌 DNA 提取方法[J]. 重庆医科大学学报, 2008, 33(2): 155-158
- [2] Hao M, Liu ZY, Yang TS, et al. Overview of bacterial genomic DNA extraction method[J]. Bulletin of Biology, 2014, 49(3): 4-6 (in Chinese)
郝敏, 刘占英, 杨天舒, 等. 细菌基因组 DNA 提取方法概述[J]. 生物学通报, 2014, 49(3): 4-6
- [3] Zhang TT, Wang L, Gong P, et al. Optimization of genomic DNA extraction method of *Staphylococcus aureus*[J]. Food Research and Development, 2014, 35(3): 8-10 (in Chinese)
张涛涛, 王兰, 龚频, 等. 金黄色葡萄球菌基因组 DNA 提取方法的优化[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(3): 8-10
- [4] Chen H, Rangasamy M, Tan SY, et al. Evaluation of five methods for total DNA extraction from western corn rootworm beetles[J]. PLoS One, 2010, 5(8): e11963
- [5] Özkan M, Yılmaz EI, Lynd LR, et al. Cloning and expression of the *Clostridium thermocellum* L-lactate dehydrogenase gene in *Escherichia coli* and enzyme characterization[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2004, 50(10): 845-851
- [6] Dong YL. Optimization of bacterial DNA extraction method[J]. China High-Tech Enterprises, 2012(1): 41-43 (in Chinese)
董艳磊. 细菌 DNA 提取方法的优化[J]. 中国高新技术企业, 2012(1): 41-43
- [7] Guo HY, Yu C, Guo WS, et al. Comparative study of microbial genome DNA extraction methods from the gastrointestinal tract of murine embryos[J]. Biotechnology, 2012, 21(4): 37-40 (in Chinese)
郭海勇, 于超, 郭伟生, 等. 小鼠胚胎胃肠道细菌基因组 DNA 提取方法比较[J]. 生物技术, 2012, 21(4): 37-40
- [8] Shen DX, Feng ZC, Du J. Comparison of bacterial DNA extraction method[J]. Central Plains Medical Journal, 2004, 31(10): 20-22 (in Chinese)
沈德新, 封志纯, 杜江. 细菌 DNA 提取方法比较[J]. 中原医刊, 2004, 31(10): 20-22
- [9] Li R, Chen DY, Chen P, et al. DNA extraction of Green-covering Guanyin Tuqu[J]. China Brewing, 2010(11): 127-128 (in Chinese)
李睿, 陈道玉, 陈平, 等. 绿衣观音土曲细菌 DNA 的提取[J]. 中国酿造, 2010(11): 127-128
- [10] Yang WJ, Liu HZ, Chen JY, et al. Effect of SDS on emulsification of aqueous lysozyme[J]. Engineering Chemistry & Metallurgy, 1996, 17(3): 254-258 (in Chinese)
杨为进, 刘会洲, 陈家铺, 等. SDS 对溶菌酶溶液乳化作用的影响研究[J]. 化工冶金, 1996, 17(3): 254-258